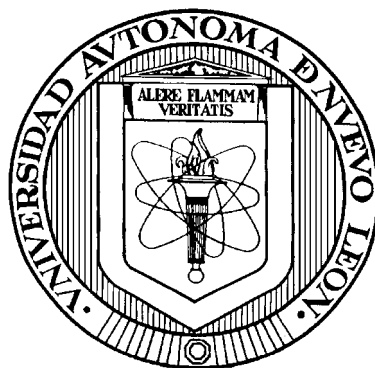


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE EN
PACIENTES VIH POSITIVOS MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISPOT CON
LAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 Y ALFA CRISTALINA EN EL ESTADO
DE NUEVO LEÓN.**

Por

M.S.P. GRACIELA IRMA MARTÍNEZ TAMEZ.

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN MEDICINA

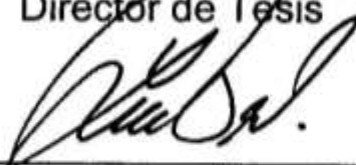
JULIO 2008

**DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE EN
PACIENTES VIH POSITIVOS MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISPOT CON
LAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 Y ALFA CRISTALINA EN EL ESTADO
DE NUEVO LEÓN.**

Aprobación de la Tesis:



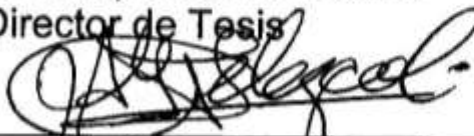
Dr. med. José Manuel Ramírez Aranda.
Director de Tesis



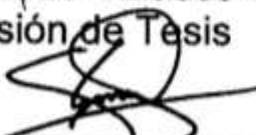
Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera.
Co-Director de Tesis



Dr. Sc. Jorge Enrique Castro Garza
Co-Director de Tesis



Dr. Sc. José Gerardo Velasco Castañón.
Comisión de Tesis



Dr. med. Santos Guzmán López
Comisión de Tesis



Dr. med. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes de mi comisión de tesis:

Dr. med. José Manuel Ramírez Aranda, Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera, Dr. Sc. Jorge Castro Garza, Dr med. Santos Guzmán López y Dr. Sc. José Gerardo Velasco Castañón por su apoyo en la dirección y realización de este proyecto.

Especialmente al Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera por su invaluable apoyo paciencia y dedicación para realizar y concluir esta investigación.

Al Dr. med. Santos Guzmán López por su cooperación y apoyo para el avance y culminación del presente trabajo.

A la M.C. María Guadalupe Rodríguez López por su colaboración en la realización de este proyecto.

A todas y cada una de las personas que contribuyeron de una forma u otra para realizar un logro más en mi vida.

DEDICATORIA

A mi esposo Dr. José Ángel Méndez Pérez, a mis hijos Graciela Irma y Ángel Méndez Martínez por su confianza y entusiasmo en mi superación.

A mi familia por su apoyo incondicional.

A Dios porque me ha dado la fuerza la salud y la oportunidad para superarme en mi vida profesional.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	8
3. ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN.....	12
3.1. Originalidad.....	12
3.2. Justificación.....	13
4. HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	15
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
6.1 Material.....	18
6.1.1 Recursos Físicos.....	18
6.1.2 Recursos materiales.....	18
6.2 Métodos.....	19
6.2.1 Tipo de estudio.....	19
6.2.2. Población de estudio.....	19
6.2.3 Criterios de inclusión.....	19
6.2.4 Criterios de exclusión.....	19
6.2.5 Estimación del tamaño de la muestra.....	20
6.2.6. Procedimiento para llevar a cabo el estudio.....	21
6.3 Prueba de PPD.....	21
6.4 Prueba de ELISPOT utilizando ESAT-6, CFP-10 y Alfa Cristalina.....	22
6.5 Análisis Estadístico.....	31
7. RESULTADOS.....	33
7.1.- Descripción sociodemográfica del estudio.....	34
7.2 Antecedentes de importancia.....	38
7.3 Resultados de la prueba de PPD.....	43
7.4 Comparación de los resultados de la Prueba de PPD y ELISPOT con las diferentes proteínas.....	43
7.5 Análisis estadístico.....	47
8. DISCUSIÓN.....	51
9 . CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
9.1 Conclusión.....	55
9.2 Recomendaciones.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57
APÉNDICES.....	63
A.Cartas de consentimiento informado.....	64
B. Hoja de registro de datos clínicos.....	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.-Análisis descriptivo de la edad en la muestra estudiada	34
Tabla 2.-Distribución de pacientes según estado civil	35
Tabla 3.-Distribución de pacientes según grado de escolaridad	36
Tabla 4.-Distribución de pacientes según Entidad Federativa de procedencia	37
Tabla 5.-Comparación de la prueba de PPD con resultado negativo con ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina	44
Tabla 6.- Comparación de la prueba de PPD con resultado positivo con ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina	45
Tabla 7.-Asociación entre la reactividad al PPD y la proteína ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina	47
Tabla 8.-Comparación de los resultados obtenidos según PPD y ESAT-6	48
Tabla 9.-Comparación de los resultados obtenidos según PPD y CFP-10	49
Tabla 10.-Comparación de los resultados obtenidos según PPD y alfa cristalina	50

LISTA DE FIGURAS

Figura I.- Distribución de la muestra estudiada según antecedentes de importância	38
Figura II.- Distribución de la muestra estudiada según convivencia con pacientes con Tuberculosis	39
Figura III.- Distribución de la muestra estudiada según convivencia previa con pacientes con Tuberculosis	40
Figura IV. -Distribución de la muestra estudiada según tiempo de convivencia previa con pacientes con Tuberculosis	41
Figura V.- Distribución de la muestra estudiada según valoración de cicatriz de BCG	42
Figura VI.- Distribución de la muestra estudiada según reactividad al PPD	43
Figura VII.-Distribución de la muestra estudiada según pruebas aplicadas	46

RESUMEN

Graciela Irma Martínez Tamez

Fecha de Graduación: Julio, 2008.

Título del estudio: DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA LATENTE EN PACIENTES VIH POSITIVOS MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISPOT CON LAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 Y ALFA CRISTALINA EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN.

Número de páginas: 67

Candidato para el grado de:
DOCTOR EN MEDICINA

Propósito y método del estudio:

Este estudio permitirá determinar la prevalencia de Infección Tuberculosa Latente (ILT) en los pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) positivos mediante la prueba de ELISPOT utilizando tres diferentes proteínas: El antígeno blanco de secreción temprano-6 (ESAT-6 por sus siglas en inglés), la proteína de filtrado de cultivo-10 (CFP-10) y alfa-cristalina en comparación con la prueba de PPD. Para lograr este objetivo se incluyeron 70 pacientes, 57 del sexo masculino (81.4%) y 13 del sexo femenino (18.6%) con un promedio de edad de 39 años, los cuales se captaron en la consulta No. 23 de Hospital Dr. José E. González de la U.A.N.L., a los que se les realizó la prueba de PPD y ELISPOT utilizando las proteínas ESAT-6, CFP-10 y alfa-cristalina.

Contribuciones y Conclusiones:

La implementación de métodos para el diagnóstico temprano de la tuberculosis latente en pacientes VIH positivos con baciloscopía negativa, con infección extrapulmonar o con resistencia para alguna droga antifúngica, permitiría incluir al individuo dentro de un programa de administración oportuna y estrictamente supervisada de los medicamentos antifúngicos y antirretrovirales adecuados, disminuyendo la incidencia y mortalidad causados por la asociación TB/SIDA, así como la generación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a los medicamentos.

En conclusión la prueba del PPD y ELISPOT usando la proteínas de ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina son igual de útiles para el diagnóstico de ILT en pacientes HIV positivos.



Dr med. José Manuel Ramírez Aranda
Director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) se reconoce por primera vez en 1981 en los Estados Unidos de América¹, identificándose el agente causal de esta enfermedad en 1983, como un nuevo virus al que se le asignó el nombre de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).²

En la actualidad, el VIH se ha diseminado por todo el mundo y para finales del 2007 el número de personas infectadas superaba los 33.2 millones, la mayoría viviendo en países con recursos limitados para la atención de salud como son África, y Asia.³ Se estima que existen 4.9 millones de nuevas infecciones por VIH y 3.1 millones de muertes por SIDA por año.⁴ Se calcula que cada día se infectan 6,800 personas con el VIH y fallecen 5,700 a causa del SIDA.⁵

En México desde el inicio de la epidemia de SIDA hasta diciembre del 2007, se han registrado de manera acumulada 115,651 casos. El 85% de los casos acumulados de SIDA corresponden a hombres y el 15% a mujeres, estableciéndose una relación hombre-mujer de 6:1. Según el registro

nacional de casos de SIDA, actualmente se encuentran vivos el 42% de los mismos. Por otra parte, se calcula que existen de 116 a 177 mil personas infectadas por el VIH (asintomático) en el grupo de 15 - 49 años.⁶⁻⁸

Nuevo León ha registrado un total de 4,270 casos acumulados de VIH/SIDA de 1995 a 2007. Durante el período de 1998 a Diciembre del 2007 se han acumulado 1,056 pacientes VIH positivos, de los cuales 780 casos se mantienen en esta condición según registros a la fecha de los cuales 168 son mujeres y 612 hombres, se tienen en control a 83 pacientes totalmente asintomáticos.^{9,10}

La tuberculosis es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, cada año se estima que hay ocho millones de personas en el mundo que se enferman y existen entre 16 y 20 millones de casos.

Cada día en el mundo 20,000 personas desarrollan tuberculosis activa y mueren 5,000 por esta causa, una persona muere por tuberculosis cada 10 segundos, con dos millones de muertes cada año.

En América se presentan 400,000 casos nuevos cada año y 75,000 muertes por dicha causa.

En México, la tasa de incidencia varía de acuerdo a los diferentes estados, entre 4.2 y 37 casos por cada 100,000 habitantes. Durante 2005, Nuevo León registró un total de 1.165 nuevos casos de tuberculosis.

La OMS estima que el número de personas coinfectados por VIH y tuberculosis, desde el inicio de la epidemia del SIDA hasta el 2000, era de aproximadamente 11 a 13 millones en el mundo, mientras que en el continente Americano se han registrado 51,000 casos de coinfectados lo cual corresponde a una prevalencia del 0.4% con una mortalidad del 13%.⁶

En México el total de casos registrados VIH positivos es de 28,068 de los cuales 2,133 están coinfectados con TB (7.5%) con una relación VIH sin TB y VIH con TB de 13:1.^{7,8}

Del año de 1998 al 2007 se detectaron un total de 4,989 casos de tuberculosis en el Estado de Nuevo León, de éstos, 76 casos en control están coinfectados con SIDA.^{9,10}

La interacción en pacientes coinfectados con VIH y TB es bidireccional y sinérgica. La coinfección de TB acelera el progreso de la infección por el VIH. La presentación de la tuberculosis es inversamente proporcional al conteo de linfocitos CD4 y carga viral: a menor conteo de CD4 y más alta carga viral, es mayor la probabilidad de presentar tuberculosis.¹² Al comparar la cuenta de linfocitos CD4 en pacientes VIH positivos sin tuberculosis con pacientes coinfectados con VIH-TB se encontró que el riesgo relativo de muerte y desarrollo en otras infecciones oportunistas es más alto en los pacientes

coinfectados. La progresión acelerada del VIH se atribuye directamente a la respuesta inflamatoria tardía de hipersensibilidad retardada.⁴

Se han realizado estudios que señalan que la probabilidad de un individuo infectado por VIH de contraer la infección tuberculosa al exponerse al bacilo es más alta que la de un individuo no infectado. Asimismo, una vez contraída la infección tuberculosa, la probabilidad de desarrollar TB activa es de 5% a 15%.^{4,11}

Otro aspecto importante en relación al tratamiento para la tuberculosis en pacientes con VIH/SIDA es que al prescribir el tratamiento estándar puede ser menos efectivo por mala absorción de los fármacos lo cual provoca niveles terapéuticos inferiores, además de las interacciones con otros medicamentos para el VIH. Lo que trae como consecuencia una mayor probabilidad de que aparezcan cepas bacterianas con resistencia a los medicamentos cuando los pacientes no completan su esquema de tratamiento.^{3, 12}

Las características clínicas de quienes sufren ambas infecciones difieren de los casos que sólo padecen tuberculosis, particularmente al progresar la inmunodeficiencia. Los cuadros pulmonares con frecuencia son atípicos o más graves,¹³ antes de la pandemia del VIH los estudios en pacientes inmunocompetentes reportaban que la tuberculosis extrapulmonar constituía cerca del 15 al 20% de todos los casos de TB. En pacientes con SIDA la

tuberculosis extrapulmonar es más frecuente y llega a afectar hasta un 50% de todos los casos ¹⁴ .

En el diagnóstico por laboratorio se ha encontrado que el frotis del esputo con tinción para Bacilos Acido Alcohol Resistentes, (baciloscopía o BAAR) tiene una sensibilidad de 50-70% en pacientes coinfectados VIH/TB y rara vez da un resultado positivo. Por otro lado, la radiografía de tórax es atípica y presenta infiltrados difusos intersticiales en los lóbulos inferiores, consolidación similar a la neumonía bacteriana y ausencia de cavitaciones. ⁴

El otro método de diagnóstico utilizado es el cultivo bacteriano en medio de Lowenstein-Jensen. Este método tiene la desventaja de que el crecimiento tarda entre 2 y 8 semanas, ya que *Mycobacterium tuberculosis* es de crecimiento muy lento y un resultado positivo no es evidente en forma inmediata. ¹⁵

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite la determinación más rápida del agente patógeno al identificar un fragmento específico de su ADN; la desventaja de esta técnica es que en muestras negativas la sensibilidad es de un 84-92%, en BAAR positivos y de 41-75% en BAAR negativos. ¹⁶

La habilidad de *M. tuberculosis* para infectar un paciente y permanecer latente por años, sin que se manifiesten signos y síntomas de enfermedad resulta en la falta de detección de personas infectadas. Esto facilita la

cadena de transmisión de la enfermedad y es un obstáculo clave que evita el control y eliminación de la tuberculosis.¹⁶ De tal forma que para el diagnóstico de infección latente se acepta como Prueba de Oro (Gold Estándar) el PPD, que estimula la población específica de linfocitos T para producir citocinas (interferón γ), factor de necrosis tumoral e interleucinas, así como células de respuesta inflamatoria dando por resultado un área con eritema e induración, en el sitio de la aplicación, a las 48 a 72 hs posteriores a la aplicación.¹⁷

De acuerdo a la Sociedad Americana de Tórax (SAT), el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) y la Academia Americana de Pediatría (AAP) de los Estados Unidos de América, la prueba de PPD se considera positiva cuando se produce una induración mayor a 5 mm, en contactos con casos infecciosos, aquellos con radiografía anormal, pacientes con VIH y otros inmunodeprimidos; con una induración mayor a 10 mm en aquellos residentes de países con alta incidencia de TB, en residentes en áreas de hacinamiento (prisiones, orfanatos, entre otros), en población de bajos ingresos, en drogadictos, en aquellos con factores médicos de riesgo (diabetes, neoplasias, uso de corticosteroides, etc), en trabajadores de la salud y poblaciones catalogadas como de alto riesgo y por último, mayor a 15 mm en aquellos sin ningún factor de riesgo.^{17,18}

Esta prueba tiene como limitante que no es altamente específica, ni sensible. De 10 a 20 % de las personas con tuberculosis activa no presentan reacción (falsos negativos). Esto puede ocurrir en las fases tempranas de la enfermedad, por el tiempo necesario para que los linfocitos T monten una respuesta al PPD, lo que produce un retraso para la detección de entre 2 a 10 semanas posteriores a la infección.^{17,18} Otro inconveniente es que la vacunación previa con BCG en ocasiones da lugar a una reacción cruzada con ésta prueba, dando falsos positivos. Por el contrario, en procesos de anergia, da falsos negativos ya que un número elevado de pacientes con menos de 200 linfocitos CD4 /mm³, no responden como consecuencia de la inmunodepresión severa que presentan ¹⁶.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

La infección latente de tuberculosis (ILT) se presenta cuando bacilo de la TB se encuentra en el organismo (generalmente en los pulmones), sin que se presenten síntomas evidentes, pero presenta reacción positiva a la prueba de PPD.

En este momento son varias las técnicas que se están desarrollando con la finalidad de poder detectar la infección latente por *M. tuberculosis*, esto debido a la importancia que tiene el realizar el diagnóstico para poder iniciar un tratamiento oportuno.

El *M. tuberculosis*, posee un antígeno de 6- kDa el cual se ha designado como proteína ESAT-6 (Antígeno Blanco de Secreción Temprana-6), y otro de 10-kDa denominado proteína CFP-10 (Proteína de Filtrado de Cultivo-10). Estas proteínas tienen la característica de que solamente se encuentran en *M. tuberculosis* y *M. bovis* patógena pero no se encuentran en las

micobacterias del medio ambiente ni en la micobacteria de la vacuna BCG.

16,19,20

Los primeros estudios con estas proteínas fueron realizados en animales, donde se utilizó la ESAT-6 y la CFP-10 para medir la respuesta de los linfocitos T en ganado infectado con *Mycobacterium bovis* y en ganado que fue sensibilizado con una micobacteria del medio ambiente. La prueba diferenció entre el ganado que sí estaba infectado con *M. bovis* del que solamente había estado expuesto a la micobacteria del medio ambiente.²¹

Con base en estos resultados se han desarrollado pruebas diagnósticas específicas para la detección de *M. tuberculosis*. El ensayo inmunoenzimático (ELISPOT de fase sólida) utiliza células mononucleares aisladas del paciente, las cuales se estimulan con las proteínas ESAT-6 y CFP-10 y se determina la producción de interferón γ mediante la visualización de manchas o puntos en placas de micro ELISA.^{16, 20, 22, 23}

Existen estudios donde se comparan los ensayos basados en células T (ELISPOT) con la prueba PPD. Ewer y cols.(2003), realizaron un estudio en alumnos de una escuela en la que se registró con un brote de tuberculosis y encontraron que la prueba de ELISPOT ofrece una forma más precisa para identificar los individuos con infección tuberculosa latente en comparación con la prueba de PPD, con lo que se puede alcanzar un mejor control y un tratamiento más preciso de la enfermedad.²⁴

Por otro lado, Lalvany y cols. compararon el PPD en pacientes con cultivos positivos para tuberculosis y en pacientes con enfermedades no tuberculosas, dando como resultado que el ELISPOT tenía una sensibilidad de 96% cifra significativamente más alta que el 69% del PPD. Otro dato muy importante es que prueba es que en enfermedades que no eran causadas por *M. tuberculosis* no se presentaron resultados falsos negativos, ni en pacientes con tuberculosis diseminada.²⁵

Chapman y cols. sugirieron que la prueba de ELISPOT podría ser útil en la evaluación diagnóstica de pacientes sospechosos con TB activa en regiones de alta prevalencia, además por su alta sensibilidad podría apoyar en particular en el diagnóstico de TB extrapulmonar.²³

En varios estudios se ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad al detectar la producción de interferón γ por monocitos estimulados con los antígenos ESAT-6 y CFP-10 en pacientes con tuberculosis activa,²⁵⁻²⁸ en personas sanas no expuestas^{26,29,30} y recientemente en pacientes infectados con PPD positivo independientemente de la vacunación por BCG.^{24,26,29,31}

La prueba de ELISPOT se ha utilizado en estudios donde se incluyen pacientes VIH positivos. En Italia, Vincenti y cols.¹⁶ realizaron un estudio donde identificaron epítopes de ESAT-6 para el diagnóstico de tuberculosis activa e incluyeron 17 pacientes VIH/SIDA.

Por otro lado Chapman y cols.²³ realizaron un estudio en 39 pacientes VIH positivos en Zambia. En ambos estudios los resultados apoyan el hecho de que la prueba de ELISPOT tiene más sensibilidad que el PPD.

Una proteína que se conoce como alfa cristalina debido a su descubrimiento inicial en los ojos de algunos vertebrados, recientemente, se demostró que contribuye a la estabilidad de las proteínas de *M. tuberculosis*, y disminuye la tasa de autólisis de organismos en fase latente. Las células bacterianas sobre expresan la proteína en condiciones hipóxicas y esto ha sido asociado al engrosamiento de la pared, estabilización de la estructura celular, así como a la inducción de otras proteínas de choque térmico.³²⁻³⁴

En este proyecto de investigación se pretende establecer si estas proteínas contribuyen a la detección temprana de la infección tuberculosa latente.

CAPÍTULO 3

ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Originalidad

Hasta ahora, el diagnóstico de infección tuberculosa latente en pacientes VIH positivos depende de la prueba de PPD (mayor de 5 mm de induración), la cual puede generar una reacción cruzada con componentes de la vacuna BCG dando resultados falsos positivos y/o en un proceso de anergia dar resultados falsos negativos.

El utilizar la prueba de ELISPOT con ESAT-6 y CFP-10 en pacientes VIH positivos, aumentará la detección oportuna de TB latente así como la indicación de tratamiento oportuno y la implementación de medidas preventivas. El desarrollo de este proyecto nos permitirá además determinar el valor de la detección de la proteína alfa cristalina como marcador de latencia en pacientes VIH positivos, lo cual no se ha reportado en la literatura.

3.2 Justificación

El aumento inusitado que tuvo la incidencia de tuberculosis en los países desarrollados, pero muy especialmente en los países en vías de desarrollo, ha alarmado a las autoridades sanitarias de todo el mundo y esto se debe en parte a la infección de VIH/SIDA. Se espera que para los próximos 10 años la TB conjuntamente con el SIDA cause la muerte de 130 millones de personas y afecte principalmente población joven económicamente activa, por lo que éstos serán los padecimientos infectocontagiosos de más serias repercusiones en la salud pública y en consecuencia, un gran reto para todas las entidades responsables de la salud.

En estas condiciones el reto será el de implementar procedimientos que permitan diagnosticar tempranamente la tuberculosis latente en pacientes VIH positivos con baciloscopía negativa o con infección extrapulmonar o con resistencia para las drogas antifímicas. Lo anterior permitirá ubicar al individuo dentro de un programa que incluya la administración oportuna y estrictamente supervisada del medicamento antifímico y antirretroviral adecuados, con el fin de disminuir la incidencia de TB/SIDA y la generación de micobacterias resistentes a los medicamentos.

Si se quiere ganar la batalla contra estas enfermedades infecciosas (o contra cualquier otra), no sólo se deben dirigir los esfuerzos a la detección y tratamiento del paciente enfermo, sino que es también de vital importancia,

dirigir esfuerzos por evitar que el individuo susceptible pueda enfermar, y que la prevención y la detección oportuna tengan un lugar mas relevante.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS Y VARIABLES

4.1 Hipótesis

El uso de las proteínas específicas del bacilo de la tuberculosis (ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina) utilizando la prueba de ELISPOT detectará de manera estadísticamente significativa una mayor proporción de pacientes con infección latente tuberculosa que los diagnosticados con PPD.

4.2. Variables de estudio

Las variables a medir comprenden: edad, género, escolaridad, antecedente de contacto con paciente con tuberculosis, vacunación con BCG, PPD reactor o no reactor.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia de Infección Tuberculosa Latente (ILT) en los pacientes VIH positivos mediante la aplicación de PPD en comparación con la prueba de ELISPOT que utiliza las proteínas ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina.

5.2. Objetivos específicos

- 5.2.1. Describir las características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el estudio.
- 5.2.2. Determinar la concordancia de resultados positivos de la prueba de PPD y la prueba de ELISPOT con las proteínas ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina en pacientes VIH positivos.
- 5.2.3. Establecer la frecuencia del diagnóstico de ILT con la prueba de ELISPOT utilizando las proteínas ESAT-6 y CFP-10 y Alfa cristalina positivas con respecto al diagnóstico de la prueba de PPD positiva.

5.2.4. Comparar el diagnóstico de ILT con la prueba de ELISPOT que utiliza la proteína alfa cristalina contra el diagnóstico de la prueba de ELISPOT con las proteínas ESAT-6 y CFP-10

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL

6.1.1 Recursos Físicos:

Se dispuso de consultorios los cuales se utilizaron para explicar al paciente el protocolo y solicitar su consentimiento informado. Asimismo se contó con salas para aplicación del PPD y de toma de muestras. La prueba de ELISPOT se realizó utilizando las proteínas ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “*Dr. José Eleuterio González*”.

6.1.2. Recursos materiales:

- PPD
- Kit de T-SPOT TB Oxford Immunotec con las proteínas ESAT-6 y CFP-10
- Proteína Alfa cristalina.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Tipo de estudio:

Se realizó un estudio transversal, descriptivo, analítico.

6.2.2. Población de estudio:

Pacientes VIH positivos diagnosticados y atendidos en la Clínica de VIH de la Consulta No. 23, en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

6.2.3 Criterios de inclusión:

- Pacientes VIH asintomáticos, portadores de anticuerpos antiVIH-1 determinados mediante las pruebas de ELISA y Western blot.

- Mayores de 18 años de edad.

- Pacientes VIH asintomáticos sin infección tuberculosa activa

6.2.4 Criterios de exclusión:

- Niños

- Mujeres embarazadas

- Pacientes que no deseen participar en el estudio

- Pacientes con SIDA y TB

- Pacientes con SIDA

6.2.5 Estimación del tamaño de la muestra.

La fórmula para el tamaño de la muestra es:

$$Nz^2pq$$

Formula: $n = \frac{Nz^2pq}{d^2(N-1) + z^2pq}$

$$d^2(N-1) + z^2pq$$

$$\frac{165 \times (1.96)^2 \times 0.3 \times 0.7}{(0.1)^2 \times (165-1) + (1.96)^2 \times 0.3 \times 0.7} = 55$$

$$(0.1)^2 \times (165-1) + (1.96)^2 \times 0.3 \times 0.7$$

n = tamaño de la muestra de estudio

N = tamaño de la población

(Incidencia estatal de VIH en Nuevo León, 165 casos)

p = proporción VIH positivos = 30%.

$q = (1-p)$ = proporción de casos negativos = 70%.

d^2 = error estándar = 10%.

z = valor estandarizado de una distribución normal

(1.96 para el 95% de confiabilidad)

La proporción estimada se obtiene en base a la referencia bibliográfica y

datos proporcionados por el Consejo Estatal de SIDA. ^{10,11}

Tamaño de la muestra 55 sujetos de estudio.

6.2.6. Procedimiento para llevar a cabo el estudio.

Por medio de visitas diarias se captaron los pacientes que acudieron a consultar a la Clínica de VIH de la Consulta No. 23 del Hospital Universitario, a los pacientes VIH positivos con diagnóstico confirmado que reunieron los criterios de inclusión se les informó acerca del protocolo y se les invitó a participar en él, se les pidió el consentimiento informado (*Apéndice A*) y una vez obtenido se realizó el registro de datos (*Apéndice B*).

A todos los pacientes se les aplicó la prueba de PPD y se les tomó la muestra de sangre para el ELISPOT.

El resultado del PPD se valoró a las 72 horas. Los resultados de laboratorio posteriormente fueron comunicados a los pacientes. El paciente que dio un resultado positivo a PPD o a ELISPOT, se envió para su valoración a la Consulta No. 23 del Hospital Universitario.

6.3 PRUEBA DE PPD

La prueba de PPD se realizó por personal de enfermería capacitado. En ésta técnica se utilizó 0.1 ml (que equivale a una potencia de 2 UT de PPD RT- 23) que fueron aplicados por vía intradérmica en la cara antero interna del antebrazo izquierdo, en la unión del tercio superior con el tercio medio. Posteriormente se procedió a la lectura a las 72 hs, que es cuando se

presenta la máxima induración, con el brazo levemente flexionado. Se midió en milímetros con una regla el tamaño que corresponde al diámetro máximo transversal al eje mayor del brazo área de la induración producida. En los casos donde no se presentó induración se anotó 0 x 0 mm de induración en lugar de negativo.

El resultado positivo fue una induración mayor a 5 mm. ^{18,31}



6.4 PRUEBA DE ELISPOT UTILIZANDO ESAT-6, CFP-10 Y ALFA CRISTALINA

El ensayo de (ELISPOT) es una prueba inmunoenzimática en la cual utilizaron tres proteínas: ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina para estimular las células mononucleares del paciente y así observar la liberación del interferón γ . Este interferón γ liberado por las células es el que se mide por una

reacción enzima-sustrato. Esta reacción se visualiza en placas de micro ELISA en forma de “manchas” ó puntos.^{16, 20, 23}

I.- Principios del procedimiento:

Se separaron las células mononucleares de sangre periférica de una muestra de sangre total, se lavaron y se contaron, añadiéndose a pocillos de microtitulación revestidos con una membrana recubierta previamente con un anticuerpo contra la citocina. Para cada muestra se requirieron 5 pocillos los cuales se distribuyeron de la siguiente forma: Un control nulo en donde se analizó la secreción de citocina inespecífica, tres pocillos, uno para el antígeno de ESAT-6, otro para el antígeno CFP-10 y otro para el antígeno de Alfa cristalina y por último se utilizó un control positivo con fitohemaglutinina como prueba de la viabilidad de las células mononucleares

II.- Preparación de los reactivos

Se preparó la placa de microtitulación retirándola del refrigerador para dejar que alcanzara la temperatura ambiente, se preparó una dilución 1:200 de la solución de trabajo del reactivo conjugado, esta solución se preparó inmediatamente antes de su uso. Es necesario que todos los reactivos utilizados estén a temperatura ambiente.

Se realizó una dilución de la proteína alfa cristalina hasta una concentración final de 1 µg en 50 µl.

Las muestras de sangre se conservaron a temperatura ambiente y se analizaron el día de su extracción.

Para la preparación del medio de cultivo celular se realizó un precalentamiento a 37°C antes de utilizarlo en el ensayo.

La prueba de ELISPOT se efectuó de la siguiente forma:

Para la obtención de células mononucleares, se tomó sangre venosa periférica en tubos CPT de 10 ml. La sangre se conservó a temperatura ambiente (18 a 25° C), sin refrigerarla ni congelarla.



Una vez que se obtuvo la muestra se centrifugaron los tubos CPT a 1800 x G por 28 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), se recuperó la banda de células mononucleares. Con una pipeta se transfirió a un tubo de centrifugado cónico de 15 ml., el cual se enrasó con 10 ml del medio de cultivo celular RPMI-1640.



Se centrifugó nuevamente a 600 G durante 7 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el gránulo en 1 ml. de medio, se enrasó a 10 ml con medio fresco y se centrifugó a 350 G durante 7 minutos.



Posteriormente se retiró el sobrenadante y se volvió a resuspender el gránulo en 0.7 ml del medio de cultivo AIM-V, en esta etapa se utilizó este medio debido a que es el más indicado para la incubación, al compararlo con el RPMI-1640.



Para el recuento celular se realizó una suspensión celular final con 40 μl de solución azul de tripano al 0.4% (p/v) con 10 μl de la suspensión celular final, se colocó una alícuota adecuada en el hemocitómetro y se contaron las células en la cuadrícula.



Se calculó la concentración de células viables en la suspensión celular madre. Se prepararon 700 μl de la suspensión celular final en una concentración de 2.5×10^5 células en 100 μl .

Para la preparación e incubación de la placa de microtitulación primeramente se retiró del refrigerador y se dejó a que alcanzara la temperatura ambiente.

Cada muestra se procesó en 5 pocillos individuales donde se incluyeron un control nulo y un control positivo de viabilidad celular.

A cada uno de los pocillos se les agregó lo siguiente:

50 μ l del medio de cultivo celular a cada pocillo del control nulo,

50 μ l de solución del antígeno ESAT-6 a los pocillos que sea necesario,

50 μ l de solución del antígeno CFP-10 a los pocillos que sea necesario,

50 μ l de solución de alfa cristalina a los pocillos que sea necesario y

50 μ l de solución de control positivo a cada pocillo de control de viabilidad celular

Para la muestra de un paciente, se añadió a cada uno de los 5 pocillos 100 μ l de la suspensión celular final conteniendo 250,000 células viables.

Se incubó la placa en una incubadora con humidificador a 37° C con CO₂ al 5% durante 16 a 20 horas.



Para el revelado y recuento de las manchas, se retiró la placa de la incubadora y se desechó el medio de cultivo celular. Posteriormente se añadieron 200 μ l de solución de PBS a cada pocillo, se desechó la solución de PBS y se repitió el lavado del pocillo 3 veces más con solución PBS.

Para la obtención de la solución de trabajo se diluyó el reactivo conjugado (anticuerpo monoclonal murino contra interferón γ , conjugado con fosfatasa alcalina), el cual está concentrado 200 veces, esta dilución se realizó utilizando el PBS como diluyente.

Posteriormente se añadieron 50 μ l de solución del reactivo conjugado a concentración de trabajo a cada pocillo y se incubó de 2 a 8 ° C durante 60 minutos.



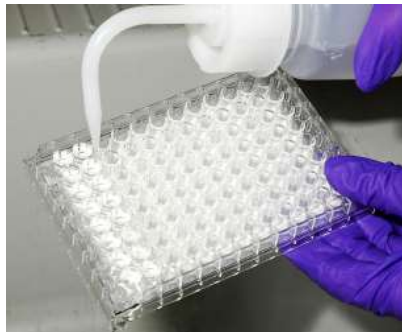
Una vez concluida la incubación se desechó el conjugado y se efectuaron cuatro lavados con PBS.



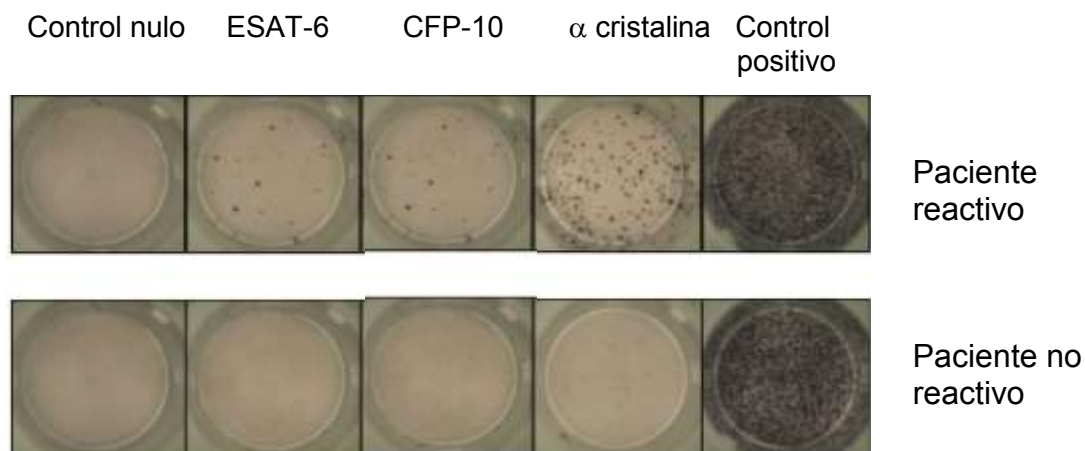
Se añadieron 50 μ l de solución de sustrato (BCIP/NBT) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 7 minutos.



Se lavó la placa minuciosamente con agua destilada o desionizada para detener la reacción de detección.



Se dejó secar la placa en un área bien ventilada o en un horno a una temperatura máxima de 37°C, Se contaron y registraron el número de manchas azul oscuro, bien diferenciadas en la membrana de cada pocillo. Se aplicaron los criterios de análisis de la prueba para determinar si la muestra de un paciente es reactiva o no reactiva a los antígenos de la tuberculosis.



Para el control de calidad se estableció que un recuento de manchas del control nulo superior a 10 debe considerarse “indeterminado”. Los resultados de tal muestra pueden ser difíciles de interpretar y posiblemente sea necesario repetir el análisis.

Típicamente el recuento de manchas del control positivo de viabilidad celular debería ser igual o mayor a 20 o presentar saturación (demasiadas manchas que impiden el recuento). Una proporción de pacientes pueden tener linfocitos T que muestren sólo una respuesta limitada a la fitohemaglutinina. Si ninguno de los pocillos del control positivo ó los 3 antígenos es positivo, se repitió la prueba para confirmar los resultados.

Si el control positivo no fue reactivo, pero se obtuvo un resultado reactivo para uno o más pocillos la prueba se consideró reactiva.

Debido a las posibles variaciones biológicas y sistemáticas, un intervalo de recuentos de manchas entre 5 y 7 se consideró como “zona gris” e indicó la necesidad de considerar dicho resultado como “indeterminado”.

Interpretación de los resultados

Para los criterios de análisis: un resultado típico sería la presencia de pocas manchas o ausencia total en el pocillo del control nulo, el resultado de la prueba es reactivo si uno o varios pocillos responden de acuerdo con los siguientes criterios:

Si el control nulo tiene de 0 a 5 manchas la muestra será reactiva si: (recuento de manchas del pocillo)–(recuento de manchas del control nulo) es mayor o igual a 6.

Si el control nulo tiene 6 o más manchas la muestra será reactiva si: (recuento de manchas del pocillo) es mayor o igual a dos x (recuento de manchas del control nulo).

Un resultado reactivo indica que la muestra contiene linfocitos t efectores reactivos a *Mycobacterium tuberculosis*. Un resultado no reactivo indica que la muestra probablemente no contiene linfocitos T efectores reactivos a *Mycobacterium tuberculosis*.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La codificación, captura de datos y análisis estadístico de la información se realizó utilizando el SPSS versión 16. Se evaluaron las estadísticas descriptivas tradicionales (medidas de tendencia central, de dispersión y de posición) para las variables cualitativas, así como la frecuencia de las variables cuantitativas. Se elaboró una tabla de 2 x 2 para determinar sensibilidad y especificidad, así como valor predictivo positivo de las pruebas ESAT-6, CFP-10 y Alfa cristalina, considerando el PPD como Prueba de Oro.

Se buscó la presencia de asociación significativa entre positividad de las pruebas antes mencionadas a través de la evaluación por J_i^2 ; así como la correlación de Kappa de Cohen entre los resultados de PPD y cada una de las pruebas estudiadas.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

Se analizaron un total de 70 pacientes VIH positivos diagnosticados y atendidos en la Consulta de Medicina Preventiva del Hospital Universitario “ Dr. José Eleuterio González ”, los cuales cumplieron los criterios pre-establecidos en el presente protocolo, ellos conforman una muestra representativa y significativa de la población a analizar. A cada paciente se le solicitó la firma de una carta de consentimiento informado. Posterior a esto, se procedió a la realización de la historia clínica, examen médico, aplicación de PPD y toma de sangre para su procesamiento. Los pacientes se citaron a las 48 horas para valoración del resultado de PPD y resultados de las pruebas de laboratorio.

7.1.- DESCRIPCIÓN SOCIODEMOGRÁFICA DEL ESTUDIO.

La edad promedio de los participantes fue de 39 años.

TABLA No. 1

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA EDAD EN LA MUESTRA ESTUDIADA

GÉNERO	FRECUENCIA	%
MASCULINO	57	81.4
FEMENINO	13	18.6
TOTAL	70	100

N= 70

Fuente. Instrumento estandarizado, encuesta.

De los 70 pacientes incluidos en el protocolo se observó un marcado predominio del género masculino con 57 casos (81.4%) y 13 casos (18.6%) del género femenino (*Tabla No. 1*).

TABLA No.2
DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN ESTADO CIVIL

VARIABLE	FRECUENCIA	PORCENTAJE
ESTADO CIVIL:		
SOLTERO	59	84.3
CASADO	5	7.1
UNION LIBRE	3	4.3
VIUDO	3	4.3
TOTAL	70	100

n= 70

Fuente. *Instrumento estandarizado, encuestas.*

En su mayor parte 59 (84%) los pacientes referían un estado civil de soltería, seguido por casados 5 (7%), unión libre 3 (4%) y viudos 3 (4%) (*Ver Tabla No. 2*).

TABLA No.3
DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN GRADO DE ESCOLARIDAD

VARIABLE:	FRECUENCIA	PORCENTAJE
ESCOLARIDAD		
SECUNDARIA	43	61.4
PRIMARIA	12	17.1
PROFESIONAL	7	10
PREPARATORIA	5	7.1
TECNICA	3	4.3
TOTAL	70	100

n= 70

Fuente. *Instrumento estandarizado, encuesta.*

En cuanto al grado de escolaridad 43 (61%) de ellos presentaban un nivel escolar máximo de secundaria, seguido de primaria en 12 (17%), profesional 7 (10%) preparatoria 5 (7%) y técnica 3 (4%) (*Tabla No. 3*).

TABLA No. 4
DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN ESTADO DE PROCEDENCIA

ESTADO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NUEVO LEÓN	48	68.6
SLP	9	12.9
COAHUILA	3	4.3
TAMAULIPAS	3	4.3
VERACRUZ	3	4.3
DURANGO	2	2.9
CHIHUAHUA	1	1.4
ZACATECAS	1	1.4
Total	70	100

n= 70

Fuente. *Instrumento estandarizado, encuesta.*

Cuando se analizó el Estado de procedencia de los integrantes del estudio, encontramos que 48 (69%) de ellos fueron oriundos del Estado de Nuevo León, seguido de San Luis Potosí con 9 (13%), Coahuila, Tamaulipas y Veracruz, cada uno con una frecuencia de 3 (4%), Durango 2 (3%), mientras que solamente se registró un paciente de Chihuahua y otro de Zacatecas (Ver Tabla No. 4).

7.2 ANTECEDENTES DE IMPORTANCIA.

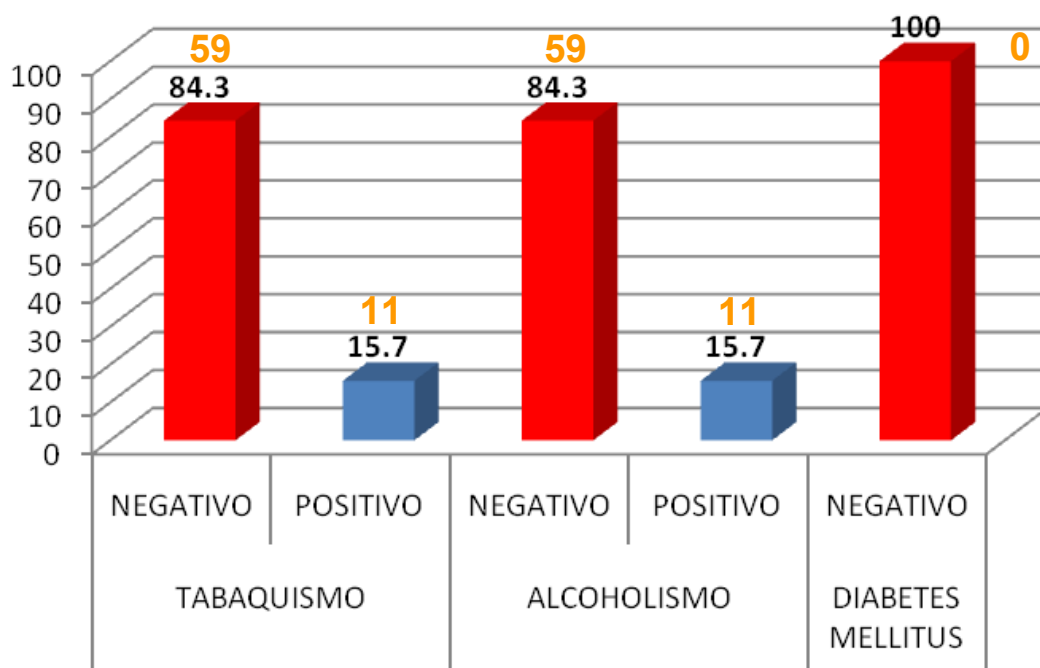


FIGURA I DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA SEGÚN ANTECEDENTES DE IMPORTANCIA.

n= 70

Fuente. Instrumento estandarizado, encuesta.

En el análisis de los antecedentes de riesgo para la población general, presentes en los integrantes del estudio, se observó que 11 (15.7%) de ellos presentaron tabaquismo activo, el mismo porcentaje mostró alcoholismo y ninguno de los estudiados presentó Diabetes mellitus (Ver Figura I).

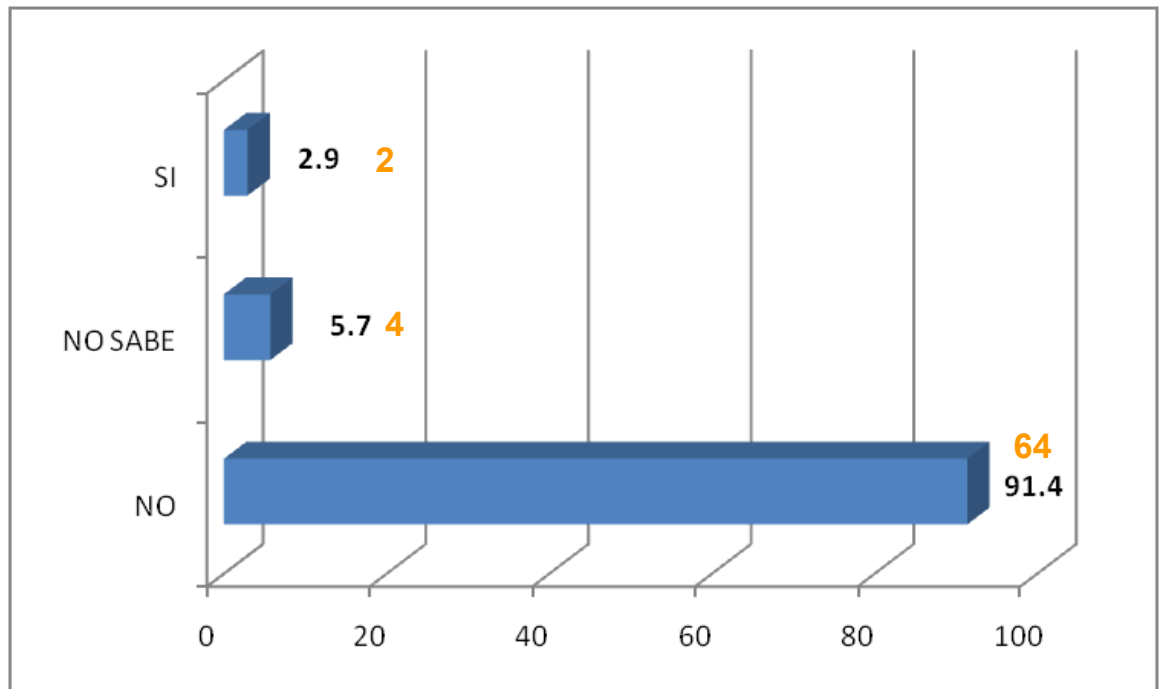


FIGURA II DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA SEGÚN CONVIVENCIA CON PACIENTES CON TUBERCULOSIS.

n= 70

Fuente. Instrumento estandarizado, encuesta.

En cuanto a la convivencia con pacientes con tuberculosis, dos pacientes (2.9%) refirieron que si convivieron con pacientes con tuberculosis, cuatro (5.7%) no sabía si había convivido y 64 (91.4%) no tenía antecedente de convivencia (Ver Figura II).

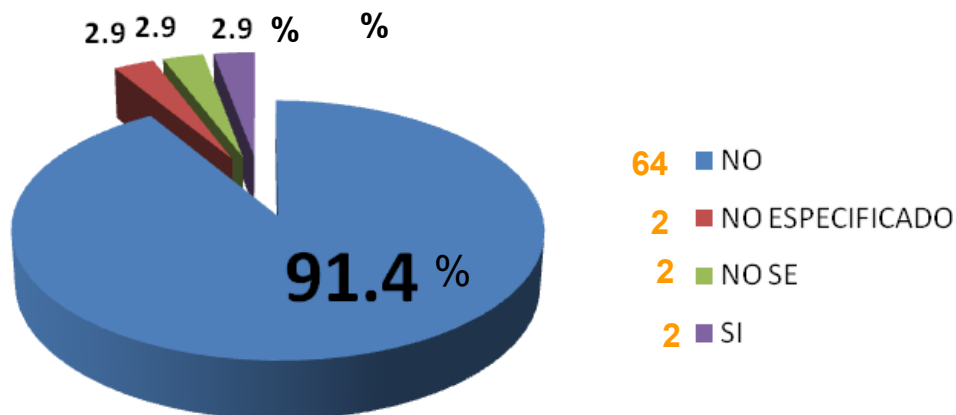


FIGURA III DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA SEGÚN CONVIVENCIA PREVIA CON PACIENTES CON TUBERCULOSIS.

n= 70

Fuente. Instrumento estandarizado, encuesta.

De igual manera en el análisis del contacto previo con personas con tuberculosis dos pacientes (2.9%) refirieron contacto previo, dos (2.9%) no especificaron y dos (2.9%) lo desconocieron y el resto niego haber tenido contacto (Ver Figura III).

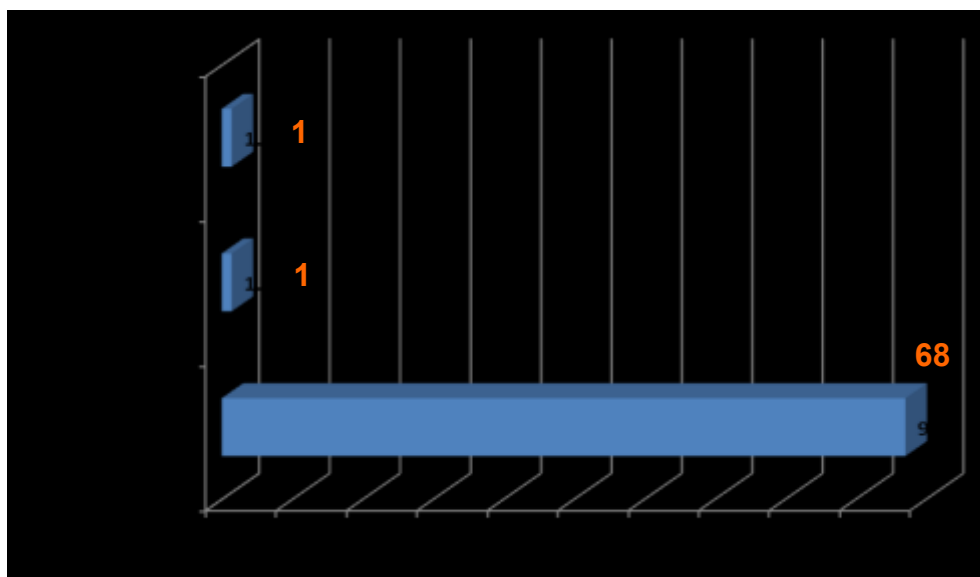


FIGURA IV DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA SEGÚN TIEMPO DE CONVIVENCIA PREVIA CON PACIENTES CON TUBERCULOSIS

n= 70

Fuente. Instrumento estandarizado, encuesta.

En cuanto a los pacientes que si estuvieron en contacto con pacientes que tenían tuberculosis, un paciente (1.4%) refirió que ese contacto fue por mas de 6 meses, un paciente (1.4%) no especificó el tiempo de contacto y el resto no estuvieron en contacto 68 (97.1%) (Ver Figura IV).

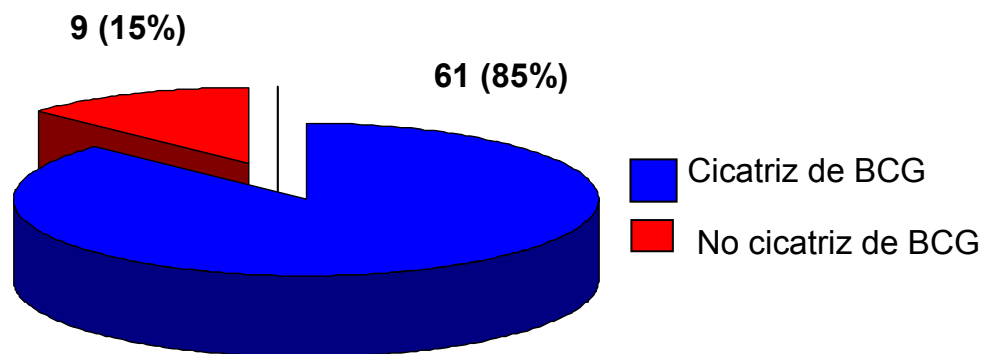


FIGURA V DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA SEGÚN VALORACIÓN DE CICATRIZ DE BCG

n= 70

Fuente. *Instrumento estandarizado, estudio especializado de laboratorio*

En lo referente a la vacunación con BCG los 70 (100%) pacientes que se incluyeron en el estudio tenían el antecedente de vacunación con BCG y 61 (85%) presentaron la cicatriz de la vacuna (*Ver Figura V*).

7.3 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PPD.

Se analizaron los estudios de laboratorio realizados a los integrantes del estudio, donde se observó reactividad al PPD en 13 pacientes (18.6%) de los 70 participantes (*Ver Figura VI*).

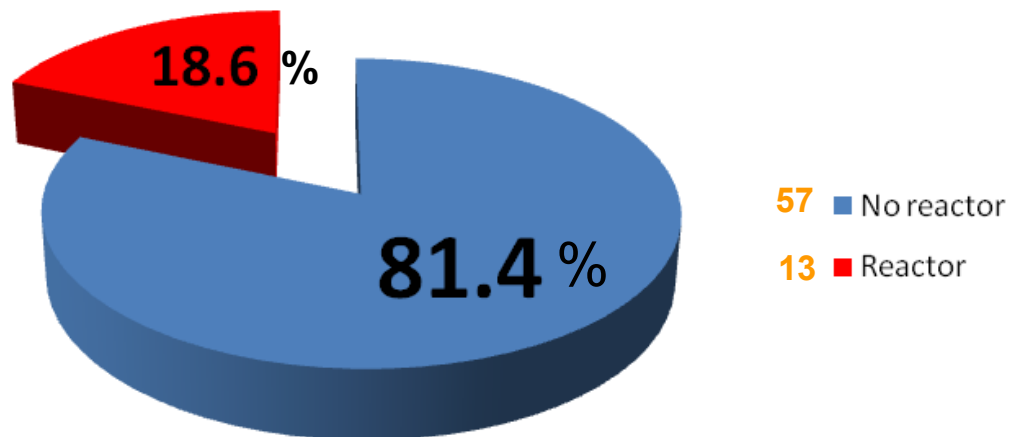


FIGURA VI DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA SEGÚN REACTIVIDAD AL PPD.

n=70

Fuente. *Instrumento estandarizado, encuesta.*

7.4 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PPD Y ELISPOT CON LAS DIFERENTES PROTEÍNAS

En cuanto a los resultados de las diferentes pruebas que se utilizaron, se encontró que en relación a la aplicación de PPD en los 13 pacientes positivos el mayor diámetro fue de 30 X 29 mm, los diámetros de induración más frecuentes fueron 20 X 20 mm y 10 X 14 mm.

De los setenta pacientes que se incluyeron en el estudio, 57 (81.4 %) fueron no reactores a PPD, de los cuales 40 (70 %) dieron resultados negativos a todas las pruebas aplicadas (ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina) Once (19%) dieron positivas las 3 pruebas de ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina. Cuatro (7%) resultaron positivos solamente a alfa cristalina, dos (3.5 %) pacientes dieron el ESAT-6 y CFP-10 positivo y alfa cristalina negativa (Ver Tabla No.5 y Figura VII).

TABLA No. 5
COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE PPD CON RESULTADO NEGATIVO
CON ESAT-6, CFP-10 Y ALFA CRISTALINA

Pacientes	PPD	Induración	ESAT-6	CFP-10	α cristalina
40	Negativo	0x0 mm	Negativo	Negativo	Negativo
11	Negativo	0x0 mm	Positivo	Positivo	Positivo
4	Negativo	0x0 mm	Negativo	Negativo	Positivo
2	Negativo	0x0 mm	Positivo	Positivo	Negativo

n= 70

Fuente. Instrumento estandarizado, estudio especializado de laboratorio

Los 13 (18.6 %) reactores a PPD presentaron los siguientes resultados: en 5 pacientes (38%) se reportaron zonas de 10 a 27 mm de induración en la valoración del PPD a las 48 horas, con el resto de las pruebas negativas. En un caso (7.6%) se presentó una induración de 20 x 20 mm

y todas las pruebas positivas. En cuatro (31%) pacientes se reportaron zonas de induración de 10 a 22 mm, con ESAT-6 y CFP-10 negativos y alfa cristalina positiva. En tres (23%) pacientes se reportaron zonas de induración de 10 a 30 mm, con ESAT-6 y CFP-10 positivos y alfa cristalina negativa. Se encontró positividad a la prueba de ESAT-6 y CFP-10 en 17 casos (24.3%) de los cuales 4 tenían el PPD positivo para el diagnóstico de ILT. Para la proteína alfa cristalina se reportó positividad en 20 casos (28.6%) de los cuales cinco presentaban el PPD positivo (Ver *Tabla No. 6 y Figura VII*).

TABLA No. 6
COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE PPD CON RESULTADO
POSITIVO CON ESAT-6, CFP-10
Y ALFA CRISTALINA

Pacientes	PPD	Induración	ESAT-6	CFP-10	α cristalina
5	Positivo	10x 8 mm 10x14 mm 10x13 mm 27x10 mm 20x20 mm	Negativo	Negativo	Negativo
1	Positivo	20x20 mm	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	18x19 mm 22x20 mm 10x13 mm 15x20 mm	Negativo	Negativo	Positivo
3	Positivo	10x14 mm 30x27 mm 30x29 mm	Positivo	Positivo	Negativo

n= 70

Fuente. Instrumento estandarizado, estudio especializado de laboratorio

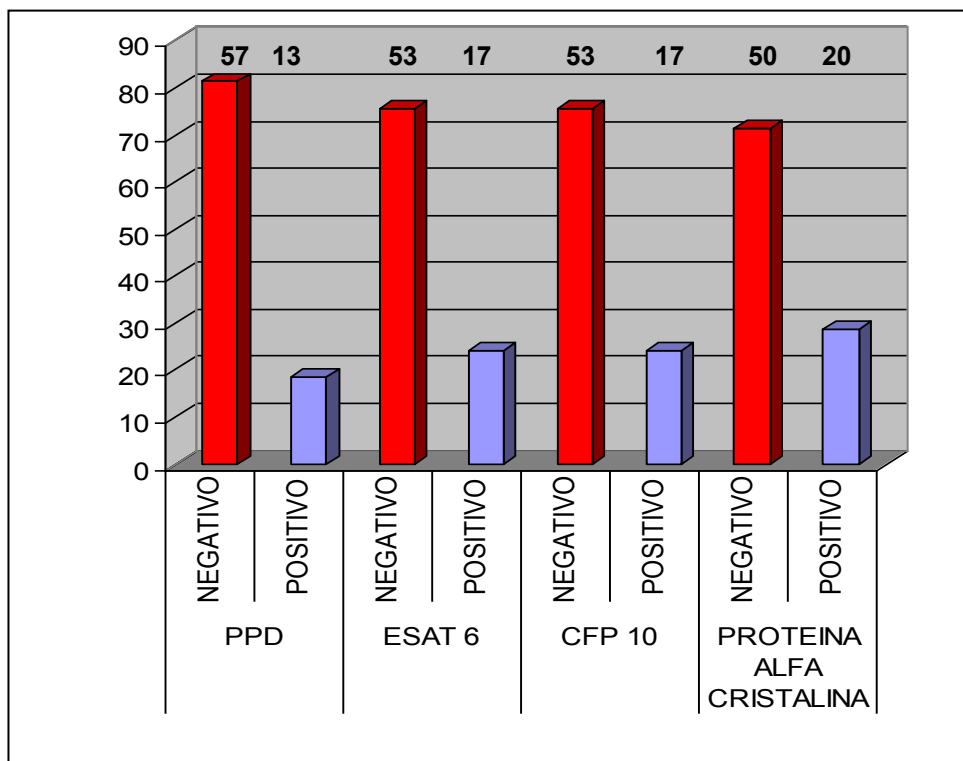


FIGURA VII DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LA MUESTRA ESTUDIADA SEGÚN PRUEBAS APLICADAS.

n= 70

Fuente. Instrumento estandarizado, estudio especializado de laboratorio

7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cuando se segmentó la población según la presencia o ausencia de reactividad al PPD como diagnóstico de ILT y se comparó la frecuencia porcentual de positividad y negatividad según las pruebas de ESAT-6, CFP-10 y proteína alfa cristalina mediante pruebas de hipótesis para proporciones a una confiabilidad del 95%, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en alguno de los casos ($p > 0.05$).

Cuando se analizó la presencia de asociación entre la reactividad del PPD y la positividad en las pruebas específicas realizadas, no se encontró asociación estadística en las pruebas de ESAT-6 ($Ji^2 = 0.06$, valor de $p = 0.8059$), CFP-10 ($Ji^2 = 0.06$, valor de $p = 0.8059$) y proteína alfa cristalina ($Ji^2 = 0.286$, valor de $p = 0.5929$) (Ver Tabla 7).

TABLA No. 7

ASOCIACIÓN ENTRE LA REACTIVIDAD AL PPD Y LA PROTEÍNA ESAT-6, CFP-10 Y ALFA CRISTALINA

ESAT- 6	
Ji^2	0.060
Valor de p	0.8059
CFP -10	
Ji^2	0.060
Valor de p	0.8059
α CRISTALINA	
Ji^2	0.286
Valor de p	0.5929

n= 70

Fuente. Instrumento estandarizado, estadístico.

TABLA No.8

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS SEGÚN PPD Y ESAT-6

		PPD		TOTAL
		REACTIVO	NO REACTIVO	
ESAT 6	POSITIVO	4	13	17
	NEGATIVO	9	44	53
TOTAL		13	57	70

n= 70

Fuente. *Instrumento estandarizado, estadístico.*

Se evaluó la certeza diagnóstica de los estudios, cuando se comparó el PPD como Prueba de Oro, se encontró que la prueba de ESAT-6 presentó una sensibilidad del 30.7% (IC 95%: 9% a 61%), una especificidad del 77% (IC 95%: 64% a 87%), un valor predictivo positivo del 23.5% (IC 95%: 6.9% a 50%) y negativo del 83% (IC 95%: 70% a 92%) y con un índice Kappa de Cohen de 0.0712 resultado que no es significativo estadísticamente, con un IC de 95% (Ver Tabla No. 8).

TABLA No. 9
COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
SEGÚN PPD Y CFP-10

		PPD		TOTAL
		REACTIVO	NO REACTIVO	
CFP 10	POSITIVO	4	13	17
	NEGATIVO	9	44	53
TOTAL		13	57	70

n= 70

Fuente. *Instrumento estandarizado, estadístico.*

La prueba de CFP 10 marcó una sensibilidad del 30.7% (IC: 9.2% a 61.3%), una especificidad del 77.1% (IC: 64.1% a 87.2%), un valor predictivo positivo del 23.5% (IC: 6.9% a 49.9%) y negativo del 83% (IC: 70.1% a 91.9%) y un índice de Kappa de Cohen de 0.0712 resultado que no es significativo estadísticamente, con un IC de 95% (*Ver Tabla No. 9*).

TABLA No.10

**COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
SEGÚN PPD Y ALFA CRISTALINA**

		PPD		TOTAL
		REACTIVO	NO REACTIVO	
PROTEINA ALFA CRISTALI NA	POSITIVO	5	15	20
	NEGATIVO	8	42	50
	TOTAL	13	57	70

n= 70 *Fuente. Instrumento estandarizado, estadístico.*

Por último la prueba de Proteína alfa cristalina presento una sensibilidad del 38.4% (IC: 14.0% a 68.3%) una especificidad del 73.6% (IC: 60.3% a 84.4%), un valor predictivo positivo del 25% (IC: 8.7% a 49.1%) y negativo del 84% (IC: 70.8% a 92.8%) y un índice de Kappa de Cohen de 0.1006 resultado que no es significativo estadísticamente, con un IC de 95% (Ver Tabla No. 10).

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

La identificación y tratamiento de la infección latente tuberculosa en pacientes HIV positivos es actualmente uno de los retos más importantes de la salud pública a nivel mundial, especialmente en las áreas geográficas de alta endemicidad de tuberculosis asociada con el virus de la inmunodeficiencia humana.

Se estudiaron un total de setenta pacientes cuya edad promedio fue de 39 años, con predominio del género masculino, población similar a la estudiada por Chapman ²³ en Zambia y Karam ³⁶ en Dakar. En lo referente al estado civil, la mayoría de los pacientes manifestaron ser solteros, con escolaridad de secundaria y procedentes del Estado de Nuevo León. Todos los individuos incluidos en el estudio habían sido vacunados con BCG, dos individuos refirieron previa convivencia con pacientes con diagnóstico de tuberculosis activa.

La infección latente de tuberculosis (ILT) se presenta cuando el bacilo de la TB infecta el organismo (generalmente en los pulmones), sin que se

presenten síntomas evidentes. Para su diagnóstico se toma en cuenta que el paciente presente una reacción importante a la prueba de PPD. En esta prueba ocurre una estimulación de la población específica de linfocitos T para producir citocinas (interferón γ), factor de necrosis tumoral e interleucinas, así como células de respuesta inflamatoria dando como resultado un área con eritema e induración entre las 48 a 72 hs posteriores a la aplicación.^{17,23}

Las principales limitantes del PPD son que al no ser una prueba específica para *M. tuberculosis* y puede dar una reacción positiva luego de tener cualquier exposición a otras micobacterias, incluyendo la vacunación con el Bacilo de Calmette-Guerin (BCG). Otra desventaja es que la sensibilidad está sustancialmente reducida en sujetos VIH+, en particular si tienen enfermedad avanzada (SIDA) o infección diseminada por *M. tuberculosis* como lo refiere Vincenti.¹⁶ En poblaciones con alta prevalencia de infección por *M. tuberculosis*, la sensibilidad de la prueba de PPD limita su uso. Así, esta prueba posee altos porcentajes de resultados falsos negativos (>65% en pacientes VIH con TB activa). Chapman²³ reporta que en pacientes VIH positivos la sensibilidad del PPD disminuye de 40% a 60 % y que en pacientes con VIH y tuberculosis esta sensibilidad es del 72%.

Recientemente se han desarrollado ensayos inmunológicos que detectan la infección por *M. tuberculosis* en forma significativa. ESAT-6 y CFP-10 son

dos proteínas codificadas en el segmento RD1 del genoma del *M. tuberculosis*, las cuales no dan una reacción inmunológica en aquellas personas vacunadas con la BCG ni en las micobacterias ambientales. Con estas dos proteínas se ha desarrollado un ensayo inmunológico, el ELISPOT. Este ensayo detecta el interferón γ liberado por las células mononucleares en respuesta a estos antígenos, por lo cual es posible diferenciar una infección por *M. tuberculosis* de la vacunación con BCG o las micobacterias ambientales. Diversos autores como son: Ewer²⁴, Lawn³⁵, y Karman³⁶ mencionan que la aplicación de estas pruebas en individuos sanos tienen una sensibilidad de 89% y una especificidad de 98%, mientras que en pacientes HIV positivos con TB la sensibilidad es del 90%. En nuestro estudio encontramos que utilizando el PPD como “Prueba de Oro”, la inmuno-enzimática basada en la respuesta a las proteínas ESAT-6 y CFP-10 muestran una sensibilidad del 30.7% y una especificidad del 77.1%. Al comparar estos resultados observamos que en nuestra población de pacientes la sensibilidad y la especificidad se ubican en un rango inferior al reportado, esto puede ser debido a que en nuestro Estado la tuberculosis es una enfermedad endémica y de alta prevalencia, lo que coincide con la sensibilidad y especificidad reportada por Chapman²³ en una población de pacientes HIV positivos de Zambia, donde la sensibilidad es del 40 al 60%. En estas pruebas encontramos un valor predictivo positivo del 23.5% y negativo del 83%.

Recientemente, Stewart y col.³² describieron una proteína, la proteína alfa-cristalina la cual se ha ligado al estado latente de la tuberculosis e induce una respuesta específica en los monocitos de pacientes infectados con *M. tuberculosis* que se manifiesta por la producción de interferón γ . Al realizar esta prueba en los pacientes incluídos encontramos que la sensibilidad es de 38.4%, con una especificidad del 73.6%, un valor predictivo positivo del 25% y negativo del 84%. Aunque a simple vista la sensibilidad y especificidad de esta prueba parece ser mayor al comparar la frecuencia porcentual de positividad y negatividad según las pruebas de ESAT-6 y CFP-10 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de las pruebas ($p > 0.05$). La prueba de Kappa de Cohen mostró mínima concordancia entre la prueba de PPD y las pruebas de ELISPOT, esto pude explicarse por el hecho de que se tomó el PPD como Prueba de Oro, la cual tiene una sensibilidad más baja que las tres pruebas contra las que se comparó.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9.1 Conclusiones

- 1.- Las pruebas inmunológicas de detección como ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina tienen mejor sensibilidad que la prueba de PPD.
- 2.- Es muy pequeña la concordancia entre las respuestas del PPD y la prueba ELISPOT que utiliza ESAT-6, CFP-10 y alfa cristalina.
- 3.- Los resultados en este estudio muestran que hay casos sobre todo entre los no reactivos al PPD en donde las proteínas ESAT-6 y CFP-10 son positivas.
- 4.- Si bien la proteína alfa cristalina está descrita como una prueba más específica para el diagnóstico de ILT no existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al PPD.
- 5.- Al comparar el PPD con la prueba de ELISPOT, esta última ofrece una verdadera ventaja debido a que no incluye los problemas relacionados con la ejecución y la lectura de la intradermoreacción ni la necesidad de una segunda visita para valoración.

9.2 Recomendaciones

Se requiere establecer la utilidad de esta prueba por lo que recomendamos seguir con esta línea de investigación.

Una vez que quede establecido el valor predictivo de esta prueba para la ILT será necesario simplificarla (intradermoreacción) para utilizarla en gran escala en zonas endémicas.

Establecer el seguimiento clínico de los casos positivos por un año para evaluar la certeza diagnóstica de las pruebas de ELISPOT al compararlas con los casos clínicos de TB comprobados por baciloscopía.

Se requiere la utilización de nuevas estrategias diagnósticas confirmatorias y más específicas para el diagnóstico oportuno y prevención de la ILT.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Center for Disease Control. Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). MMWR 1982;31:507-13.
- 2.- Barro-Sinousi F, Charman JC, Roy F. Isolation of a T-Lymphotrorill retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency virus (AIDS). Science 1983;220:868-71.
- 3.-Bock N, Reichman LB. Tuberculosis and HIV/AIDS: epidemiological and clinical aspects (world perspective). Semin. Repir Crit Care Med. 2004 Jun; 25 (3): 337-44.
- 4.- Sharma SK, Mohan A, Kadhiravan T. HIV-TB co-infection: Epidemiology, diagnosis and management. Indian J. Med. Res. 2005 Apr. 121 550-67
- 5.- CDC NPIN 2007 The connection between TB and HIV
www.cdcnpin.org/scripts/tb/guide/co_inf.asp
- 6.- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) 2008. AIDS Epidemic Update 31 de Enero 2008. UNAIDS/01.56 E. Geneva: UNAIDS; 2008.
- 7.- Epidemiología del VIH/SIDA en México. CENSIDA. Abril 2008
- 8.- Panorama epidemiológico de VIH/SIDA y ETS en México. Consejo Nacional para la Prevención del VIH/SIDA. Secretaría de Salud .Diciembre 2007.
- 9.- Epi-SIDA, Secretaría de Salud de Nuevo León, 1998 a Abril 2008.
- 10.- Epi-TB Secretaría de Salud de Nuevo León 1998 a Abril 2008.

- 11.- Liberato IR, de Albuquerque M de F, Campello AR, de Melo HR. Characteristics of Pulmonary Tuberculosis in HIV seropositive and seronegative patients in a North Eastern Region of Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2004; 37: 46-50.
- 12.- Toossi Z. Virological and Immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease. J. Infect. Dis 2003; 188:1146-55.
- 13.-Narain J, Lo Y. Epidemiology of HIV-TB in Asia. Indian J. Med. Res. 2004; Oct. 120 277-89
- 14.- Sharma SK, Mohan A. Extrapulmonary tuberculosis. Indian J. Med. Res. 2004; Oct. 120, 316-53.
- 15.- Furin J, Johnson J. Recent advances in the diagnosis and management of tuberculosis. Pulmonary Medicine 2005 394-99.
- 16.- Vincenti D, Carrara S, De Mori P, Pucillo L, Petrocillo N, Palmieri F et al. Identification of Early Secretory Antigen Target – 6 Epitopes for the Immunodiagnosis of Active Tuberculosis. Molecular Medicine 2003, March-April (9) 3/4 105-111.
- 17.-Jasmer RM, Nahid P, Hoopewell PC Latent tuberculosis infection. N Engl J Med 2002; 347:1860-6
- 18.- Lavani A. Tuberculosis and tuberculin skin testing. Lancet 2001; 357:2017-21
- 19.- Soysal A, Millington K, Bakir M, Dosanjh D, Aslan Y, Keeks J *et al.* Effect of BCG vaccination on risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children

with household tuberculosis contact: a prospective community-based study.

The Lancet 2005 Oct 12

20.-Dheda K, Udwadia Z, Huggett J, Johnson M, Rook G. Utility of the antigen-specific interferon γ assay for the management of tuberculosis.

Infectious Diseases 2005, 195-202

21.- Lein, A, Von Reyn C, Ravn P, Horsburgh C, Alexander J, Andersen P. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1999; 6:606–9.

22.- Ravn P, Munk M, Andersen A, Lundgren B, Lundgren J, Nielsen L *et al*. Prospective Evaluation of a Whole-Blood Test Using *Mycobacterium tuberculosis*-Specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for Diagnosis of Active Tuberculosis. Clin Diagn. Lab. Immunol. 2005 Apr; 12 (4): 491-96.

23.- Chapman A, Munkata M, Wilkinson K, Pathan A, Ewer K, Ayles H *et al*. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. AIDS 2002 16(17): 2285-293.

24.- Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P *et al*. Comparison of T cell based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. The Lancet 2003, (361): 1168-75.

- 25.- Lavani A, Pathan AA, Mc Shane H, *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Am J Respir Crit Care Med 2001, (163):824-8
- 26.- Brock I, Welding K, Lillebaek T, Follman F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 2004; 170:65-69.
- 27.- Mori T, Sakatani M, Yamagishi T, Takashima Y, Kawabe K, Nagao E *et al.* Specific detection of tuberculosis infection: an interferon γ based assay using new antigens. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004, 170:59-64.
- 28.- Munk M, Arend S, Brock T, Ottenhoff T. Andersen P. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. J. Infect. Dis 2001 183:175-176.
- 29.-Arend S, Engelhard A, Groot G, de Boer K, Andersen P, Ottenhoff T *et al.* Tuberculin skin testing compared with T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* specific and non specific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001 8:1089-1096.
- 30.-Brock I, Munk M, Kok-Jensen A, Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Int. J. Tuberc. Lung. Dis 2001 5:462-467.

- 31.- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud. Marzo 2000.
- 32.- Stewart JN, Rivera HN, Karls R, Quinn FD, Roman J, Rivera-Macarrero CA. Increased pathology in lungs of mice after infection with an alpha-crystallin mutant of *Mycobacterium tuberculosis*: changes in cathepsin proteases and certain cytokines. *Microbiology*. 2006 Jan;152(Pt 1):233-44
- 33.- Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, Liao R, Harrell MI, Schoolnik GK. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha -crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Dec 18;98(26):15393
- 34.- Ying Y, Crane D, Simpson R, YaQi Z, Hickey M, Sherman D and. Cols. The 16-kDa α -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Aug Vol 95, 9578-83
- 35.- Lawn S. Bangali N. Vogt M et al. Utility of interferon gamma ELISPOT assay responses in highly tuberculosis-exposed patients with advanced HIV infection in South Africa. *BMC Infectious Diseases* 2007; 7:99
- 36.- Farba K, Fatou M, Fletcher H et. al. Sensitivity of INF-gamma Release Assay to Detect Latent Tuberculosis Infection is Retained in HIV-Infected Patients but Dependent on HIV/AIDS Progression. *Plos one*. January 2008/Issue 1/e 1441.

APENDICES

APÉNDICE A

FORMA DE PARTICIPACION VOLUNTARIA EN EL PROYECTO

Detección de la Infección Tuberculosa Latente en pacientes VIH positivos mediante la prueba de ELISPOT con las proteínas ESAT-6, CFP-10 y Alfa Cristalina en el Estado de Nuevo León.

Fecha:____/____/____

A QUIEN CORRESPONDA:

Declaro libre y voluntariamente que acepto participar en este proyecto de investigación que se realiza la Consulta No. 23 del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", cuyo objetivo es detectar la infección de tuberculosis latente en pacientes que tenemos la enfermedad de VIH.

Entiendo que mi participación consistirá únicamente en proporcionar o permitir que se obtenga una muestra de sangre y que se realice una prueba en el brazo lo cual no representa riesgo alguno para mi salud.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación en cualquier momento del desarrollo de ésta. Además entiendo que estoy en libertad de retirarme en el momento que desee y si tomara esta decisión no me afectará en futuros tratamientos que requiera en la institución.

Entiendo que la información obtenida de la investigación será manejada en forma confidencial y que en ningún momento se violará mi privacidad.

Firma
Paciente

Firma
Testigo

Nombre:_____

Nombre:_____

Dirección:_____

Dirección:_____

Investigador:

Nombre:_____

Dirección:_____

APÉNDICE B

HOJA DE REGISTRO DE DATOS CLÍNICOS

1.-Fecha __ __ / __ __ / __ __

2.-Registro __ __ __ __ __

3.- Hospital: -

1. Universitario

2. Metropolitano

I DATOS GENERALES

Nombre _____

Teléfono _____

1.-CURP _____

2.- Edad _____

3.- Género: Masculino ☐ Femenino ☐

4.- Estado Civil: Casado(a) ☐ Soltero(a) ☐

 Viudo (a) ☐ Divorciado (a) ☐

 Unión Libre ☐

5.- Nivel de escolaridad: Primaria ☐ Secundaria ☐

 Preparatoria ☐ Profesional ☐

6.- Estado de origen _____

II DATOS SOBRE EL VIH/SIDA

7.- Fecha de diagnóstico de VIH __ __ / __ __ / __ __

8.- .-Lugar de diagnóstico

9.- Fecha del examen: ELISA 1- VIH __ __ / __ __ / __ __

10.-Western blot Fecha del examen ____/____/____

11- Última Carga Viral _____ copias /ml

12.- Últimos Linfocitos CD4_____ mm³.

13.-¿Convive actualmente con personas con Tuberculosis?

Si ☐ No ☐ No sé ☐

14.- ¿Por cuánto tiempo?

Intimo-diario (más de 6 horas) ☐

Frecuente-diario (menos de 6 horas) ☐

Esporádico no diario ☐

No especificado ☐

15.-¿Ha tenido usted tuberculosis anteriormente?

Si ☐ No ☐

III RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

PPD Negativo ☐ Positivo ☐ _____mm

ESAT-6 Negativo ☐ Positivo ☐

ESAT-6 Negativo ☐ Positivo ☐

PROTEINA Negativo ☐ Positivo ☐

ALFA CRISTALINA

NOTAS ADICIONALES:

Investigador:

Firma

Nombre

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Graciela Irma Martínez Tamez.

Candidata al Grado:

DOCTOR EN MEDICINA

Tesis: Detección de la Infección Tuberculosa Latente en pacientes VIH positivos mediante la prueba de ELISPOT con las proteínas ESAT-6, CFP-10 y Alfa Cristalina en el Estado de Nuevo León.

Campo de estudio: Medicina y Salud Pública.

Biografía:

Datos Personales: Nació en Monterrey N. L. el 8 Diciembre de 1960. Hija del Sr. Edmundo Martínez A. y la Dra. Graciela Tamez de Martínez. Casada con el Dr. José Ángel Méndez Pérez y con dos hijos Graciela Irma y Ángel Méndez Martínez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Grados Obtenidos: Médico Cirujano y Partero 1977-83.
Maestría en Salud Pública 1985-1986

Experiencia Profesional:

Jefe del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UANL del 28 de Noviembre del 2003 a la fecha.
Profesor Ordinario de la Facultad de Medicina de UANL del 30 de marzo 2000 a la fecha.
Profesor con Perfil PROMEP del 2002 a la fecha.